

0- 769295

*На правах рукописи*



**БАРДИНА Надежда Владимировна**

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ  
МЕХАНИЗМА ВОССТАНОВЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ НИТРОГЕНАЗЫ  
ПРИ КАТАЛИЗЕ МОДЕЛЬНЫМ  $MgMo$  КОМПЛЕКСОМ И  
ПРИРОДНЫМ КЛАСТЕРОМ  $FeMoCo$ , ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ФЕРМЕНТА**

02.00.15 – катализ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Черноголовка – 2008

Работа выполнена в Институте проблем химической физики РАН

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук  
**Баженова Тамара Александровна**

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор  
**Шур Владимир Борисович**  
Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва

кандидат химических наук  
**Чепайкин Евгений Григорьевич**  
Институт структурной макрокинетики и  
проблем материаловедения РАН,  
г. Черноголовка

**Ведущая организация:**

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Химический  
факультет, г. Москва

Защита состоится 23 апреля 2008 г. в 10<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета Д 002.082.02 при Институте проблем химической физики РАН по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, просп. академика Н.Н. Семенова, 1, корпус общего назначения Института проблем химической физики РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института проблем химической физики РАН.

Автореферат разослан 29 февраля 2008 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА ИГиХ РАН



0000431530

**Ученый секретарь**  
диссертационного совета

доктор химических наук  
Т.С. Джабиев

**Актуальность исследования**

Нитрогеназа является ферментом, катализирующим восстановление атмосферного азота до аммиака, который необходим живым организмам для биосинтеза аминокислот и других жизненно важных азотсодержащих молекул. Несмотря на многолетние исследования, механизм нитрогеназного катализа еще далеко не ясен. Среди подходов, используемых для получения информации о работе энзимов, особое место занимает биомиметический подход, который подразумевает изучение более простых – неферментативных модельных систем, созданных с использованием принципов и методов ферментативного катализа. Применение его в настоящей работе дало возможность прояснить детали механизма восстановления субстратов в активном центре фермента, который на сегодняшний день содержит наибольшее количество нерешенных вопросов механизма биологической фиксации азота.

Объекты исследования данной диссертационной работы – это уникальные каталитические системы, созданные и изучаемые в лаборатории акад. А. Е. Шилова в ИПХФ РАН. В состав одной из них входит природный, выделенный из MoFe-белка нитрогеназы кластер  $\text{FeMoCo}$  состава  $[(\mu\text{-X})\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{гомоцитрат}]$ , являющийся центром координации и восстановления субстратов фермента. Вторая является функциональной моделью нитрогеназы, роль активного центра в которой выполняет полиядерный кластер низковалентного молибдена, образующийся при восстановлении  $\text{MgMo}$  комплекса известной структуры  $[\text{Mg}_2\text{Mo}_8\text{O}_{22}(\text{MeO})_6(\text{MeOH})_4][\text{Mg}(\text{MeOH})_6]\cdot 6\text{MeOH}$ . В оптимальных условиях эта система восстанавливает азот с высокими скоростями и является на сегодняшний день самой эффективной среди модельных протонных азотфиксирующих систем.

Сравнение реакционной способности и каталитических свойств Mo-содержащих кластеров, проводимое в одинаковых небиологических условиях, позволяет определить сходства и различия в механизме активации и восстановления инертной молекулы азота природными и искусственными системами. Таким образом, изучение механизма восстановления «малых» молекул – субстратов нитрогеназы этими системами представляет огромный интерес, что наравне с изучением строения активных центров, принимающих непосредственное участие в каталитическом цикле, поможет понять причины уникальной эффективности ферментативного восстановления молекулярного азота.

**Цель работы**

Данная работа была направлена на получение информации о механизме превращения субстратов нитрогеназы при катализе гетеробиметаллическими молибден-содержащими кластерами природного (FeMo кофактор) и искусственного (MgMo комплекс) происхождения.

Работа включала следующие задачи.

1. Изучение кинетических закономерностей восстановления ацетилена, катализируемого  $MgMo$  комплексом, и ингибирования этой реакции молекулярным азотом и оксидом углерода (II) в тех же самых условиях и с участием тех же восстановителей, что были использованы при изучении каталитической реакционной способности выделенного из фермента  $FeMoCo$ .

2. Исследование влияния потенциала внешнего донора электронов, а также кислотности и химической природы протонирующего агента на реакцию восстановления  $C_2H_2$ , катализируемую  $FeMoCo$  вне белка.

3. Сравнение каталитического поведения природного –  $FeMoCo$ , и синтетического, моделирующего функцию нитрогеназы –  $MgMo$  комплекса, на основе результатов, полученных в одинаковых небиологических условиях.

4. Синтез и исследование состава и строения соединений молибдена, участвующих в активации азота в протонных азотфиксирующих системах.

### Научная новизна

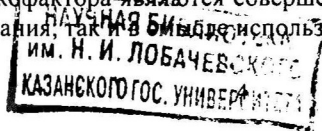
В работе впервые проведено подробное исследование каталитических свойств магний-молибденового комплекса, входящего в активный центр самой эффективной на сегодняшний день модельной азотфиксирующей системы, посредством изучения кинетических закономерностей восстановления альтернативного субстрата нитрогеназы – ацетилена. На основе полученных результатов проведено сравнение свойств как катализаторов и показано значительное сходство механизмов катализа с участием выделенного из белка активного центра нитрогеназы –  $FeMo$  кофактора и синтетического  $MgMo$  комплекса в реакциях восстановления  $C_2H_2$  и ингибирования их оксидом углерода (II).

В работе впервые приведены экспериментальные подтверждения механизма опосредованного протонирования субстрата при катализе металлическими кластерами, предсказанного ранее теоретическими расчетными методами, а также показано, что кластерные катализаторы благоприятствуют протеканию многоэлектронных окислительно-восстановительных реакций субстратов.

Впервые выделены и охарактеризованы методом PCA молибден-содержащие комплексы – продукты первичного взаимодействия  $MoCl_3$  с  $NaOCH_3$  в метаноле, являющиеся предшественниками каталитически-активных азотвосстанавливающих комплексов.

### Практическая значимость

Все полученные результаты по изучению восстановления субстратов нитрогеназы с участием в качестве катализаторов магний-молибденового модельного кластера и отделенного от белковой матрицы активного центра фермента -  $FeMo$  кофактора являются совершенно уникальными, как в смысле объектов исследования, так и в смысле использованных подходов.





Понимание химического механизма функционирования одного из самых сложных ферментов – нитрогеназы – представляет интерес для фундаментальной науки само по себе, а в дальнейшем может стать научной основой создания новых экологически чистых катализаторов и каталитических процессов с использованием принципов, реализуемых в живой природе.

### **Личный вклад автора**

Автором выполнены эксперименты по выделению железо-молибденового кофактора из MoFe-белка нитрогеназы и синтезу молибден-содержащих алкоксидных комплексов; по изучению кинетики восстановления  $C_2H_2$  в присутствии Mo – содержащих комплексов; кинетические эксперименты по взаимному влиянию субстратов и ингибиторов ( $C_2H_2$ ,  $N_2$ , CO), электрохимические эксперименты и обработка полученных результатов. РСА синтезированных кристаллов выполнен М.Ю. Антипиным и К.А. Лысенко (Центр рентгеноструктурных исследований ИНЕОС РАН), ИК – спектры записаны Ю.М. Шульгой (АЦКП ИПХФ РАН), квантово-химические расчеты выполнены совместно с А.Ф. Шестаковым (ИПХФ РАН).

### **Апробация работы**

Основные результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на международных и российских конференциях и симпозиумах: «Modern trends in organometallic and catalytic chemistry» (Москва, 2003); «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2003); «Современная химическая физика» (Туапсе, 2003, 2004.); «The 6<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference» (Тулуза, Франция, 2004); “Molecular design and synthesis of supramolecular architectures” (Казань, 2004); «Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике» (Москва, 2004, 2006); «Механизмы каталитических реакций» (Санкт-Петербург, 2006) и на Конкурсе молодых ученых им. С.М. Батурина (Черноголовка, ИПХФ РАН, 2004, 2005).

### **Публикации**

По результатам работы опубликовано 3 статьи в российских и зарубежных журналах, 9 тезисов докладов, список которых приводится в конце данного реферата.

### **Объем и структура диссертации**

Данная диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, главы, содержащей результаты работы и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 185 названий. Работа изложена на 134 страницах, включает 23 рисунка, 6 таблиц и 3 схемы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность исследований, выполненных в работе, сформулированы цели и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** изложен анализ научной литературы в области функционирования природного фермента нитрогеназы, его строения и свойств, а также истории и развития химических молибденсодержащих азотфиксирующих систем.

**Во второй главе** описаны экспериментальные методики очистки исходных реагентов и растворителей, синтеза Мо-содержащих комплексов и выделения FeMo кофактора, методики проведения реакции восстановления субстратов нитрогеназы, а также аналитические методы, использованные в работе.

**В третьей главе** приведены результаты подробного изучения кинетического исследования восстановления  $C_2H_2$  при катализе MgMo комплексом и влияния CO и  $N_2$  на этот процесс в сравнении с аналогичными данными<sup>1</sup>, полученными для системы с участием FeMoco вне белка. В этой же главе представлены и обсуждаются результаты по влиянию химической природы протонирующего агента и потенциала восстановителя при различных температурах на каталитическое восстановление ацетилена в присутствии изучаемых кластеров. Кроме того, приводятся данные по строению и квантово-химическому расчету некоторых свойств синтезированных Мо-содержащих комплексов – предшественников кластера-катализатора, изучаемого в данной работе.

### **Кинетические закономерности восстановления ацетилена при катализе магний-молибденовым комплексом**

К началу настоящей работы было показано, что выделенный из белка железо-молибденовый кофактор нитрогеназы является эффективным катализатором восстановления ацетилена, протонов, и некоторых других субстратов, а также способен обратимо координировать молекулу азота. Продуктов восстановления азота обнаружено не было. В то же время, его функциональный аналог - синтетический MgMo комплекс активно восстанавливает эти субстраты, включая азот, со скоростями, сравнимыми с нитрогеназой.

На рис. 1 приведены молекулярные структуры MgMo кластера и FeMoco. Нужно отметить, что оба они являются предшественниками активных кластеров, так как для проявления ими каталитической активности необходимо их предварительное восстановление.

---

<sup>1</sup>Баженова М.А. Каталитическое поведение FeMoco вне белка. Дисс. Канд. хим. наук, Москва: МГУ, 2001, 124с.

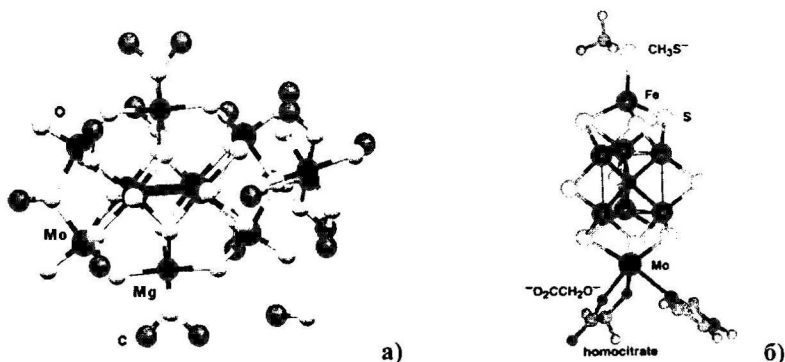


Рис. 1. Молекулярная структура MgMo комплекса (а); Структура FeMoCo в составе MoFe-белка *Azotobacter vinelandii* (б)

Для проведения адекватного сравнения свойств каталитических кластеров в качестве модельной была выбрана реакция восстановления ацетилена. Продуктами являются этилен и этан, накапливающиеся параллельно. В качестве восстановителей использовали амальгамы металлов или катод с заданным потенциалом, а в качестве доноров протонов тиофенол и ряд других соединений.

Для системы с MgMo комплексом в качестве катализатора были изучены зависимости начальной скорости модельной реакции от концентрации катализатора, субстрата, от потенциала катода, от влияния ингибитора-CO и  $N_2$ , а также методом ИК-Фурье спектроскопии исследовалась стереоспецифичность реакции (в автореферате не приводится).

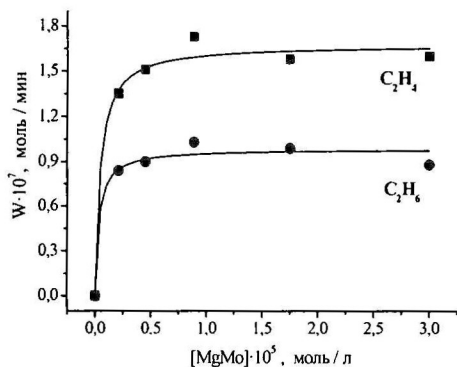


Рис. 2. Зависимость скоростей образования этилена и этана от объемной концентрации катализатора в реакции восстановления ацетилена

Условия реакции: Eu/Hg (0.35M) 0.5 мл; MgMo комплекс; [PhSH] = 0.003 M; растворитель - MeOH (4.2 мл);  $pC_2H_2$  110 Торр; 21 °C

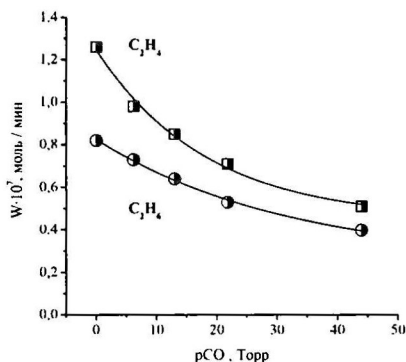
Из зависимостей скоростей образования этилена и этана от объемной концентрации катализатора в реакционном растворе (рис. 2), имеющих вид кривых с насыщением, был сделан вывод о том, что, реакции, приводящие к образованию продуктов восстановления, осуществляются на поверхности амальгамы без выхода катализатор-субстратного комплекса в объем раствора.



последующие стадии. Полученные экспериментальные данные показывают, что восстановленный MgMo кластер имеет несколько взаимозависимых субстрат координирующих центров. По-видимому, один из них, самый активный (работает при низких давлениях ацетилена) дает этан и этилен в одинаковой пропорции – при давлении ацетилена до 7 Торр доля этана составляет около 50% в продуктах реакции.

#### *Ингибирование оксидом углерода (II) восстановления ацетилена*

С целью получения информации о механизме восстановления субстратов на каталитическом кластере было проведено исследование влияния ингибирующего действия CO на каталитическое восстановление ацетилена в присутствии MgMo комплекса. Молекула CO, являясь изоэлектронным аналогом N<sub>2</sub> и C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, связывается с восстановленным в ходе каталитического цикла кластером, что приводит к уменьшению скорости накопления продуктов реакции (рис.4). Обработка кинетических данных по ингибированию CO в координатах Диксона и Корниш – Боудена (в реферате не приводятся) позволила определить тип ингибирования и рассчитать все константы процесса. Таким образом было показано, что ингибирование процесса восстановления ацетилена монооксидом углерода ( $K_i = 0.14$  атм CO) протекает по смешанному типу, причем вклад неконкурентного ингибирования оказывается больше конкурентного ( $K_i > K'_i$ ) (см. схему 2).



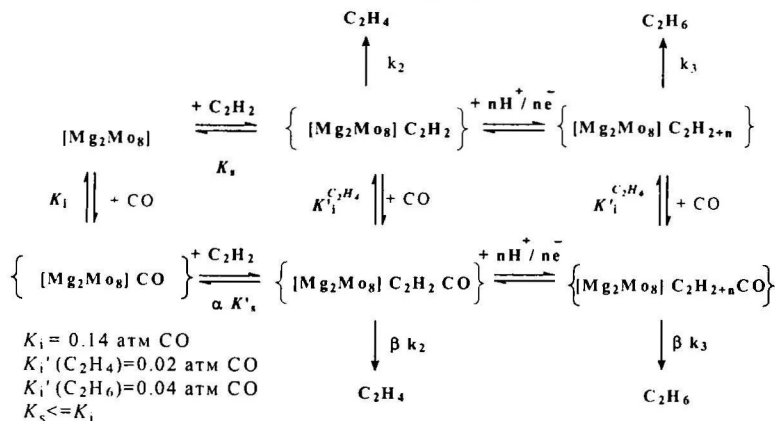
**Рис. 4.** Зависимость скоростей образования этилена и этана от давления ингибитора CO

Условия реакции:  $[MgMo] = 5 \cdot 10^{-6}$  М;  
 $[PhSH] = 0.01$  М; MeOH; Eu/Hg;  
 $p_{C_2H_2}$  107 Торр; CO; 21 °С

Интересным наблюдением оказалось различие значений констант неконкурентного ингибирования для этилена и этана, что может указывать на то, что молекула CO связывается с комплексом, уже имеющим в координационной сфере молекулу субстрата, на разных стадиях реакции восстановления ацетилена.

Данные по влиянию CO на восстановление ацетилена при катализе MgMo комплексом подтверждают ранее сделанный вывод о существовании нескольких взаимозависимых центров координации субстратов и ингибиторов на восстановленном MgMo каталитическом кластере.

Схема 2. Каталитическое превращение ацетилена в этилен и этан в системе с участием MgMo комплекса в присутствии оксида углерода (II)



*Ингибирование ацетиленом восстановления азота в системе с участием MgMo комплекса*

Для определения характеристик образующегося комплекса  $\text{N}_2$  с восстановленным MgMo комплексом и сравнения их с параметрами, полученными для природного катализатора FeMoCo, были проведены опыты по ингибированию модельной реакции молекулярным азотом. Однако в системе на основе MgMo комплекса мы не обнаружили эффекта ингибирования даже при очень низких концентрациях ацетилена в газовой фазе. Ингибирование ацетиленом восстановления  $\text{N}_2$  происходит, наоборот, очень эффективно. В связи с этим, в настоящей работе приведены данные по ингибированию восстановления  $\text{N}_2$  ацетиленом в оптимальных для восстановления азота условиях. Высокие скорости образования  $\text{N}_2\text{H}_4$  и  $\text{NH}_3$  наблюдаются в так называемой «полной» системе, когда в качестве восстановителя используется амальгама натрия, и присутствуют сокатализаторы - фосфатидилхолин и трибутилфосфин. В этих условиях ацетилен является очень хорошим субстратом с константой Михаэлиса  $K_m$  около  $3 \cdot 10^{-4}$  атм  $\text{C}_2\text{H}_2$  (найден из данных по ингибированию). Запределение же скорости реакции по концентрации азота наблюдается при давлениях  $\text{N}_2$  в несколько десятков атмосфер, а рассчитанное значение  $K_m$  для азота из данных по ингибированию восстановления азота ацетиленом составило порядка 25 атм. Не удивительно, что ацетилен эффективно ингибирует восстановление азота в этих условиях.

На рис.5 приведены зависимости скорости восстановления азота (при двух разных значениях давления  $\text{N}_2$ ) от концентрации ацетилена в газовой фазе. Прямые пересекаются на оси абсцисс «давление ингибитора» в области отрицательных значений, что свидетельствует о протекании ингибирования реакции по неконкурентному типу. Найденное значение константы ингибирования ( $K_i$ ) составило 0.009 атм  $\text{C}_2\text{H}_2$ .

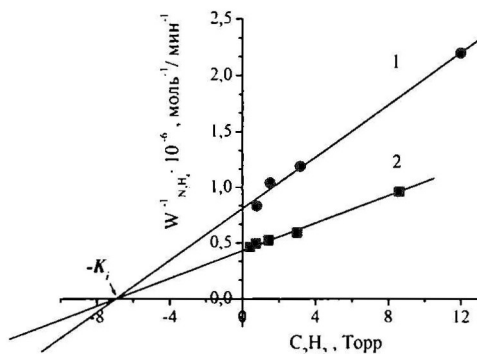


Рис. 5. Ингибирование восстановления  $N_2$  ацетиленом в «полной» системе при  $pN_2 = 400$  (1), 760 Торр (2); данные в координатах Диксона

Условия реакции:  $[MgMo] = 8.3 \cdot 10^{-6} M$ ; [фосфатидилхолин] =  $3 \cdot 10^{-4} M$ ;  $[Bu_3P] = 5 \cdot 10^{-3} M$ ;  $[NaOMe] = 6 \cdot 10^{-3} M$ ;  $[Bu_4NBr] = 0.1 M$ ; MeOH; Na/Hg (1.07 M);  $C_2H_2$ ; 21 °C

Сравнение с аналогичными данными для нитрогеназной системы *in vitro* показывает, что в природной системе и лучшей ее функциональной модели сродство каталитического кластера к ацетилену больше, чем к азоту на несколько порядков, при этом  $C_2H_2$  неконкурентно ингибирует восстановление  $N_2$  с близкими значениями констант ингибирования ( $K_i = 0.008$  атм  $C_2H_2$  в случае нитрогеназной системы *in vitro*<sup>1</sup>).

Проведенное изучение кинетических закономерностей восстановления ацетилена в системе с MgMo комплексом в качестве катализатора и сравнение с аналогичными данными для природного кластера FeMoco, выделенного из белка, показывает на значительное сходство протекания изучаемых процессов. Обе системы являются эффективными катализаторами восстановления  $C_2H_2$  и характеризуются близкими значениями констант Михаэлиса. На полиядерном MgMo комплексе, как и на восстановленном амальгамой европия FeMoco, активны к субстратам и ингибиторам несколько взаимозависимых координирующих центров. CO гораздо менее эффективно, чем при катализе FeMoco, ингибирует реакцию восстановления ацетилена, хотя, как было найдено, тип ингибирования в обеих системах смешанный: CO координируется на нескольких центрах кластера и влияет как на стадию комплексообразования  $C_2H_2$  с восстановленным кластером, так и на стадию разложения катализатор-субстратного комплекса с образованием продуктов. В обоих случаях восстановления CO не наблюдается. MgMo кластер, в отличие от FeMoco, эффективно катализирует восстановление молекулярного азота. Ацетилен является очень сильным ингибитором этой реакции. При этом ингибирования восстановления ацетилена азотом в условиях эксперимента не наблюдается, что является следствием высокого сродства MgMo комплекса к ацетилену, в несколько тысяч раз превышающего сродство к молекулярному азоту.

<sup>1</sup>Rivera-Ortiz J. M., R. H. Burris. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. J. Bacteriol., 1975, V. 123, № 2, p.537-545.

## Влияние потенциала внешнего донора электронов на реакцию восстановления ацетилена, катализируемую FeMoco вне белка и MgMo комплексом

Ранее при изучении каталитической системы с участием MgMo комплекса было обнаружено, что скорость восстановления  $C_2H_2$  экспоненциально зависит от заданного потенциала катода из амальгамы цинка в присутствии тиюфенола<sup>1</sup>. Это означает, что лимитирующей стадией процесса является перенос электрона от катода на каталитический кластер. Для проведения сравнения изучаемых систем и по этому параметру в настоящей работе представлены результаты аналогичного исследования для FeMoco вне белка в присутствии доноров протонов с различной кислотностью.

### Протонирующие агенты - тиюфенол или вода

На рис. 6 представлена экспериментально полученная зависимость скорости восстановления ацетилена до этилена от потенциала катода (Zn/Hg) в присутствии выделенного из белка FeMoco.

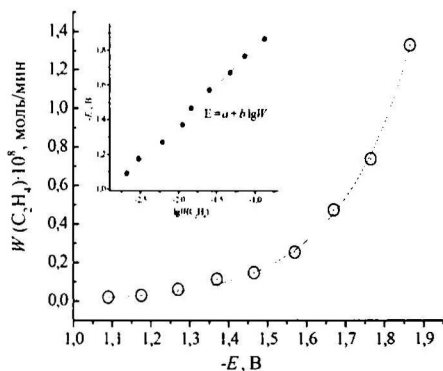


Рис. 6. Зависимость скорости накопления  $C_2H_4$  от заданного потенциала рабочего электрода<sup>2</sup>; на врезке – преобразование зависимости в координатах Тафеля

Условия реакции: электрохимическая ячейка:  $[FeMoco] = 1.2 \cdot 10^{-5}$  М;  $[PhSH] = 1.2 \cdot 10^{-2}$  М; растворитель ДМФА; электрод Zn/Hg (2 мас.%), 2 мл; площадь поверхности катода  $3.1 \text{ см}^2$ ; электрод сравнения Ag/AgCl/KCl(нас.); объем католита 6.5 мл;  $20^\circ C$ ;  $PC_2H_2$  100 Торр

Видно, что с увеличением отрицательного потенциала рабочего электрода наблюдается резкое возрастание скорости образования этилена; при этом в широком диапазоне значений потенциалов скорость реакции экспоненциально зависит от потенциала катода. Аналогичные экспоненциальные зависимости скорости реакции образования  $C_2H_4$  от потенциала рабочего электрода получены и при катодной поляризации ртутного электрода, в присутствии и тиюфенола, и  $H_2O$ . Без тиюфенола (при  $[H_2O]$  в ДМФА  $= 5 \cdot 10^{-2}$  М) заметное восстановление ацетилена начинается только при потенциале  $E \sim -1.5$  В, при этом этан не образуется ни при каких значениях катодного потенциала донной ртуты.

<sup>1</sup> Shilov A.E. Catalytic dinitrogen reduction by amalgams. In: Electron transfer in Chemistry, V. Balzani Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2001, P.899-903.

<sup>2</sup> Значения потенциалов приведены относительно насыщенного хлорсеребряного электрода (Ag/AgCl/KCl<sub>нас.</sub>)



При одинаковой величине задаваемого катодного потенциала, материал электрода также оказывает заметное влияние на скорость реакций. На катодах из разных материалов (Hg, Zn/Hg или Eu/Hg) при одинаковом потенциале, равном потенциалу амальгамы европия, и в присутствии одного и того же

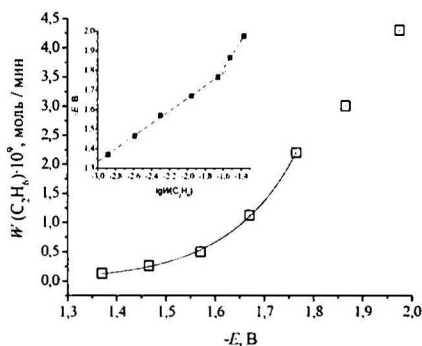
**Таблица 1.** Влияние материала катода на скорость восстановления ацетилена при заданном потенциале  $E = -1.67$  В

Катод	$W(C_2H_4) \cdot 10^7$ , моль/мин	$W(C_2H_6) \cdot 10^7$ , моль/мин
Eu/Hg	0.890	0.072
Zn/Hg	0.047	0.005
Hg	0.030	0.004

протонирующего агента – тиюфенола, абсолютные значения скорости накопления продуктов различаются (табл. 1).

Скорость реакции зависит от материала электрода, если электрохимическому превращению предшествует стадия адсорбции, поскольку теплоты адсорбции различны для реагента и активированного комплекса.

Энергию связи адсорбированной частицы с поверхностью катода определяет значение потенциала нулевого заряда, которое различно для поверхности ртути и амальгам.



**Рис. 7.** Зависимость скорости восстановления  $C_2H_2$  до  $C_2H_6$  от потенциала катода (Zn/Hg), катализатор – FeMoco (условия реакции см. подпись к рис. 6.)

Скорость образования этана, накапливающегося параллельно этилену, также экспоненциально зависит от потенциала катода. При этом, для этана зависимость имеет более сложный вид: на ней явно выделяются два тафелевских участка с различными параметрами  $a$  и  $b$  (рис. 7) и изломом зависимости при потенциале  $-1.77$  В. Для реакций с последовательным переносом нескольких электронов излом на зависимости соответствует переходу от одной лимитирующей стадии к другой, причем обе эти стадии являются стадиями переноса одного из электронов.

Аналогичная ситуация наблюдается и в случае MgMo комплекса.

### *Протонирующий агент - пентафтортиофенол*

Использование вместо тиюфенола его аналога с высокой кислотностью SH-группы – пентафтортиофенола, приводит не только к увеличению примерно в пять раз скорости реакции по этану и в три раза по этилену, которые так же, как и в присутствии тиюфенола накапливаются параллельно, но и к изменению характера зависимости скорости реакции от потенциала катода: опыты показывают, что после восстановления комплекса  $[FeMoco(H^+)(PhS)]$  до субстратсвязывающего состояния ( $E = -1.15$  В), реакция не зависит от

потенциала катода. Кроме того, скорости накопления как этана, так и этилена, практически не зависят от материала катода: поляризация чистой ртути и амальгамы цинка дает практически одинаковые скорости при одинаковых значениях потенциала. Данные наблюдения говорят о том, что перенос электрона не является лимитирующей стадией в этом случае. Вероятнее всего, пентафтортиофенол, как более сильная кислота, может осуществлять более чем однократное протонирование аниона  $\text{FeMoco}$ , что, в отличие от опытов с тиофенолом, уменьшает отрицательный заряд каталитического кластера и облегчает его адсорбцию на катоде. Все это приводит к такому увеличению скорости электрохимической стадии, что лимитирует процесс в целом одна из последующих химических стадий, происходящих в координационной сфере металлокластера, скорее всего, внутримолекулярный перенос протона на субстрат в комплексе  $[(\text{C}_6\text{F}_5\text{S})\text{FeMoco}_{(\text{red})}(\text{H}^+)(\text{C}_2\text{H}_2)]$ , ведущий к образованию продуктов из координированного ацетилена.

Изучение зависимости скорости каталитической реакции восстановления  $\text{C}_2\text{H}_2$  в присутствии  $\text{MgMo}$  комплекса показало, что скорость накопления как этилена, так и этана экспоненциально растет с увеличением потенциала катода в интервале от  $-1.07$  В до  $-1.9$  В не только в присутствии тиофенола, но и более кислого донора протонов – пентафтортиофенола. Из этого следует, что система с  $\text{MgMo}$  комплексом менее чувствительна к кислотности протонирующего агента, видимо вследствие большей протонной емкости.

### **Зависимость скорости реакции восстановления $\text{C}_2\text{H}_2$ от температуры**

В результате измерений скорости восстановления ацетилена при катализе  $\text{FeMoco}$  вне белка в присутствии тиофенола или пентафтортиофенола в потенциостатическом режиме (катод  $\text{Zn/Hg}$ ) было найдено, что скорость накопления и этилена, и этана возрастает экспоненциально с увеличением температуры в интервале от  $13$  до  $30^\circ\text{C}$ . Выше температуру не поднимали, так как  $\text{FeMoco}$  обладает ограниченной термической устойчивостью и при температуре  $40^\circ\text{C}$  в значительной степени разрушается. Рассчитанные по уравнению Аррениуса эффективные энергии активации образования продуктов реакции восстановления ацетилена приведены в таблице 2. В присутствии  $\text{PhSH}$  величины различаются, причем меньшее значение получено для этана – продукта двухэлектронного восстановления  $\text{C}_2\text{H}_2$ . В присутствии  $\text{C}_6\text{F}_5\text{SH}$  величины для образования  $\text{C}_2\text{H}_4$  и  $\text{C}_2\text{H}_6$  заметно большие по значению и одинаковые, следовательно, в параллельных реакциях, по которым образуются эти продукты, существует общая лимитирующая стадия, сопровождающаяся значительными структурными изменениями. Таким образом, изменение кислотности протонирующего агента влияет на механизм реакций восстановления субстратов нитрогеназы, катализируемых кластерами.

Изучение зависимости скорости каталитической реакции восстановления  $\text{C}_2\text{H}_2$  в присутствии  $\text{MgMo}$  комплекса показало, что скорость накопления продуктов экспоненциально растет с увеличением температуры в интервале от  $15$  до  $35^\circ\text{C}$ . Из рассчитанных по уравнению Аррениуса эффективных энергий

активации следует, что и для системы на основе катализатора MgMo комплекса  $E_{акт}$  образования  $C_2H_6$  меньше, чем  $E_{акт}$  образования  $C_2H_4$  (табл. 2) независимо от кислотности реагента.

**Таблица 2.** Энергии активации образования этилена и этана в присутствии тиюфенола и пентафтортиофенола при катализе природным и синтетическим кластерами  $[MgMo] = 1.32 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[PhSH] = [C_6F_5SH] = 1.2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ;  $pC_2H_2 = 100 \text{ Торр}$

Катализатор	условия реакции		$E_{акт}$ , ккал/моль	
	реагент	-E, В	$C_2H_4$	$C_2H_6$
FeMoco	PhSH	1.7	$18.3 \pm 1.5$	$12.8 \pm 2$
	$C_6F_5SH$	1.3	$32 \pm 2$	$32 \pm 2$
MgMo комплекс	PhSH	1.3	$9.4 \pm 0.6$	$5.4 \pm 0.6$
	$C_6F_5SH$	1.3	$7.1 \pm 0.5$	$3.7 \pm 0.9$

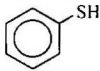
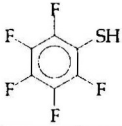
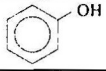

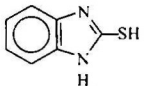
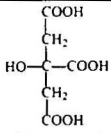

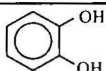
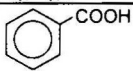
Можно сделать вывод, что общей особенностью изучаемых кластеров является то, что они представляют собой катализаторы для осуществления многоэлектронных процессов. При этом абсолютные значения  $E_{акт}$  заметно больше в присутствии FeMoco, хотя были получены из опытов, проведенных при потенциале  $-1.7 \text{ В}$ , а для системы с MgMo – при потенциале  $-1.3 \text{ В}$ . Учитывая, что с понижением потенциала при прочих равных условиях энергия активации уменьшается для систем, лимитирующей стадией которых является перенос электрона, это различие говорит о том, что в системе с MgMo комплексом наблюдается лучшая пространственная организация системы, более прочный контакт с амальгамой (восстановителем), что облегчает перенос электрона и уменьшает энергию активации.

*Влияние  $pK_a$  и химической природы реагента на скорость восстановления ацетилена, катализируемого FeMoco вне белка*

Было показано, что на восстановленном амальгамой европия FeMoco вне белка в растворе ДМФА реализуется стадия обратимой координации молекулы  $N_2$ , хотя дальнейшего восстановления азота в комплексе не наблюдалось. Для проверки предположения, что причиной этого может быть неподходящий по кислотности или химической природе источник протонов, было проведено изучение влияния характера протонирующего агента на реакции восстановления ацетилена с участием FeMoco вне белка. Кроме того, такое исследование помогает прояснить механизм протонирования субстрата в системах с участием FeMoco, который неизвестен ни для нитрогеназы *in vitro*, ни для биомиметических систем с участием кофактора.

В качестве потенциальных доноров протонов для образования  $C_2H_4$  и  $C_2H_6$  из  $C_2H_2$ , были изучены 12 соединений. Их строение и величины  $pK_a$  в  $H_2O$  и ДМФА, приведены в таблице 3. Необходимыми требованиями при выборе являлись растворимость в ДМФА и значения  $pK_a$  в ДМФА  $\geq 5$  (в более кислой среде кофактор необратимо разрушается).

Таблица 3. Значения  $pK_a$  протонирующих агентов в растворителях

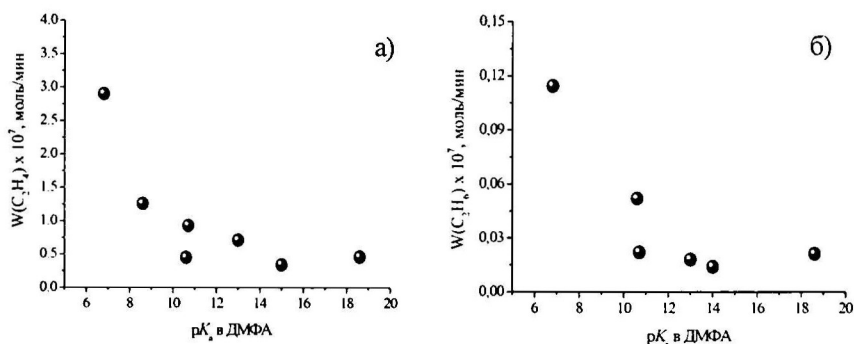
№	соединение		$pK_a$ в $H_2O$ <sup>1</sup>	$pK_a$ в ДМФА <sup>2</sup>
	молекулярная формула	название		
1		тиофенол	6.6	10.7
2		пентафтортиофенол	2.7	6.8
3		фенол	9.95	15.4
4		имидазол	14.5	18.6
5		2-меркаптобензимидазол	~8	~13
6		лимонная кислота	3.13 4.76 6.40	10.6 13.3 15.7
7		щавелевая кислота	1.2 4.2	8.6 16.6
8		пирокатехин	9.2	~15
9	$C_{18}H_{38}COOH$	стеариновая кислота	4.9	~13
10		бензойная кислота	4.2	12.3
11	$H_3PO_4$	ортофосфорная кислота	2.1 7.2 12.3	~10 ~15 ~20
12	$H_2O$	вода	15.7	~32

Выбор же химической природы соединений определялся строением лигандного окружения кофактора в белке при протекании реакции *in vivo* и *in vitro* (тиофенол, имидазол и их аналоги, вода, ортофосфорная кислота) и необходимостью «охватить» в исследовании различные классы соединений (карбоновые кислоты).

<sup>1</sup> March J. Advanced Organic Chemistry, 3rd ed., New York.: John Wiley & Sons, 1985, P. 1087-1136.

<sup>2</sup> Izutsu K. Acid-base dissociation constants in dipolar aprotic solvents. Oxford.: Blackwell Scientific, 1990.

Для каждого из приведенных соединений  $[H^+A^-]$  изучены скорости накопления  $C_2H_4$  и  $C_2H_6$  в системе  $\{FeMoco + Zn/Hg + C_2H_2 + [H^+A^-]\}$  в ДМФА. В данных условиях вода, ортофосфорная и монокарбоновые кислоты (бензойная и стеариновая), а также фенол оказались неактивными. Остальные 7 соединений, обладая различным химическим строением, в системе активны, по-видимому, благодаря своей способности образовывать с кофактором координационную связь по типу лиганд – комплексообразователь. Из зависимостей, приведенных на рис.8, видно, что значительное изменение кислотности (от 8 до 19) и различная химическая природа (при условии соблюдения возможности образования координационной связи) применяемых соединений слабо влияют на скорости накопления продуктов реакции.



**Рис.8.** Зависимости скоростей образования этилена (а) и этана (б) от  $pK_a$  протонирующего агента. Условия реакции:  $[FeMoco] = 1 \cdot 10^{-5}$  M;  $Zn(Hg)$  (4.27M) 0.7 мл  $[HA] = 1 \cdot 10^{-2}$  M; растворитель - ДМФА (4 мл); давление  $C_2H_2$  100 Торр;  $21^\circ C$

Для объяснения этого факта мы привлекли результаты всех работ, проведенных на выделенном из белка кофакторе, литературные данные по изучению влияния pH среды на нитрогеназную реакцию *in vitro*, а также, теоретические расчеты механизма протонирования в белке. Совокупность экспериментальных данных, полученных для FeMoco вне белка, указывает на сложный, а не прямой (из среды), характер протонирования субстрата. По-видимому, для осуществления реакции восстановления субстратов на FeMoco необходимо, чтобы источник протонов имел некоторое пороговое значение кислотности, при котором происходит протонирование мостикового атома серы с дальнейшим переносом водорода на субстрат. Интересно, что в области значений  $pK_a$  соединений от 8 до 19 независимость от кислотности протонирующего агента можно объяснить и тем, что для кофактора, как выделенного из белка, так и в составе фермента, стадия переноса протона не является лимитирующей. При переходе же к более «кислomu» соединению – пентафтортиофену – наблюдается смена лимитирующей стадии.

Для системы с участием MgMo комплекса, также как для нитрогеназы *in vitro* и для систем с FeMoco вне белка, мы предполагаем наличие первоначальной стадии протонирования комплекса с последующим переносом

протона на координированный субстрат, поскольку наблюдаем сложную зависимость скорости реакции от концентрации тиофенола<sup>1</sup> (что указывает на сложный характер протонирования), а также наличие зависимости скорости протекания реакции от химической природы донора протонов (активны не все соединения, даже обладающие достаточной кислотностью).

Таким образом, сравнивая экспериментальные данные, полученные при изучении восстановления ацетилена, катализируемого MgMo комплексом и FeМосо вне белка, можно сделать вывод, что механизмы протонирования сходны в обеих системах: перенос протона на субстрат осуществляется не из среды, а с первоначально протонированных атомов каталитического комплекса.

### Алкоксидные комплексы молибдена, образующиеся при первичном взаимодействии $\text{MoCl}_5$ с $\text{NaOCH}_3$ : синтез, молекулярные структуры, ИК спектры

Из двух Мо-содержащих систем, рассматриваемых в настоящей работе, синтетическим путем можно получить предшественник катализатора MgMo комплекса по реакции взаимодействия  $\text{MoCl}_5$  со щелочами ( $\text{OCH}_3$  или  $\text{OH}$ ). При этом помимо MgMo кластера образуется ряд соединений молибдена разной ядерности, которые в разной степени активны в реакции активации и восстановления азота. Механизм образования полиядерного MgMo кластера

неизвестен. В связи с этим, мы начали систематическое изучение механизма образования и строения продуктов взаимодействия пентахлорида молибдена со щелочами в метаноле – основной реакции получения модельных протонных каталитических азотвосстанавливающих систем. К настоящему времени выделены и охарактеризованы два кристаллических продукта (рис. 9, 10), полученные при разных мольных отношениях исходных реагентов.

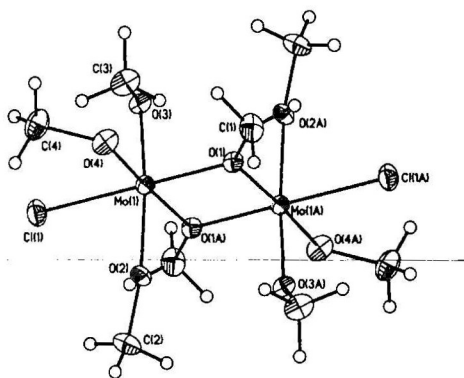


Рис. 9. Кристаллическая структура комплекса 1

Комплекс *транс*- $[\text{Cl}(\text{OCH}_3)_3\text{Mo}(\mu\text{-OCH}_3)_2\text{Mo}(\text{OCH}_3)_3\text{Cl}]$  (1) был получен при мольном соотношении  $\text{NaOCH}_3/\text{MoCl}_5 \sim 3$  в виде темно-зеленых с металлическим блеском кристаллов плохо растворимых в спирте, воде, эфире. В отличие от большинства кислород-содержащих комплексов Mo(V), комплекс 1 не содержит оксо – групп.

<sup>1</sup> Bazhenova T.A., Bazhenova M.A., Mironova S.A., Petrova G.N., Shilova A.K., Shuvalova N.I., Shilov A.E. Catalytic reduction of acetylene in the presence of molybdenum and iron clusters, including FeMo cofactor of nitrogenase. Inorg. Chim. Acta., 1997, V.270, P.221-226.

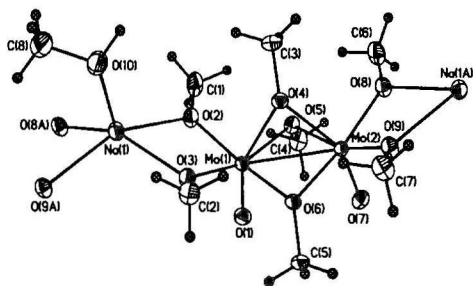


Рис. 10. Молекулярная структура фрагмента полимерной цепи в кристалле комплекса 2

При соотношении  $\text{NaOCH}_3/\text{MoCl}_5 \geq 5$  в тех же условиях образуется комплекс 2 (рис. 10), винно-красные кристаллы игольчатой формы которого хорошо растворимы в метаноле. Соединение представляет собой полимерную цепочку, содержащую катионную  $[\text{Na}(\text{MeOH})]^+$  и анионную  $[\text{Mo}_2\text{O}_2(\text{OMe})_-]^-$  части, в которой при Mo(V) находятся как метокси-, так и оксо-группы.

Литий - содержащий аналог комплекса 2 был известен ранее, тогда как комплекс 1 синтезирован в настоящей работе впервые. Причем оказалось, что соотношение Mo:Cl в комплексе оказалось равным 1:1, хотя по реакции  $\text{MoCl}_5$  с 3 эквивалентами основания это соотношение в продукте реакции должно равняться 1:2. Для объяснения причин образования комплекса с дефицитом Cl-лигандов, был проведен анализ его структуры, способа образования и свойств с привлечением методов теоретического изучения. Методами функционала плотности B3LYP и PBE были выполнены квантово-химические расчеты его строения, электронной структуры и ИК-спектра, и показано, что экспериментально найденная структура является основной по энергии. На основании рассчитанного ИК-спектра комплекса 1, который достаточно точно воспроизводит структуру экспериментального, было сделано отнесение линий в последнем. Кроме этого, был проведен анализ возможного пути образования комплекса, для чего были рассчитаны тепловые эффекты некоторых из вероятно протекающих в растворе реакций. И показано, что полученный комплекс, является устойчивым к диссоциации, и его состав обусловлен реакциями сольволиза.

Таким образом, применение теоретических методов расчета к Мо-содержащим комплексам может дать дополнительную информацию как об их структуре, так и о механизме их образования. Экспериментальное и теоретическое исследование молекулярного строения и механизма формирования молибденовых и молибден – магниевых оксо-алкоксидных кластеров высоковалентного молибдена, а также исследование процессов восстановления данных комплексов с образованием активных в катализе кластеров низковалентного молибдена будет продолжено. Это даст возможность понять особенности строения активных комплексов и определить факторы, обеспечивающие уникальную эффективность восстановления молекулярного азота протонными молибденсодержащими системами.

В четвертой главе проведен заключительный анализ полученных результатов, основанный на сравнении каталитического поведения природного FeMoCo и синтетического MgMo кластеров в реакциях с субстратами и ингибиторами нитрогеназы.

Можно выделить ряд сходных черт: обе системы являются эффективными катализаторами восстановления ацетилена до этилена и этана со сходными параметрами образования комплекса «катализатор-субстрат». Продукты образуются по параллельным маршрутам, по-видимому, из одной и той же частицы  $[\text{Cat}(\text{H})\text{PhS}(\text{C}_2\text{H}_2)]$  Cat = FeMoco или MgMo комплекс. При этом эффективная энергия активации образования этана в полтора раза меньше, чем этилена, что является необычным и наблюдалось в настоящей работе впервые для металлокомплексных каталитических систем. Было показано, что лимитирующая стадия процесса в обеих системах в присутствии тиофенола – электрохимическая, а именно, перенос электрона от катода на кластер. И FeMoco, и MgMo комплекс в изучаемых системах имеют несколько взаимосвязанных субстрат (ингибитор) координирующих центров. Оксид углерода (II) ингибирует восстановление ацетилена, при этом сам в системах не восстанавливается. Использование различных соединений в качестве доноров протонов показало, что только те, которые каким-либо образом могут взаимодействовать с катализатором, способны эффективно протонировать его и координированный субстрат, причем, кислотность агента может находиться в достаточно широком диапазоне. Механизм протонирования в обеих системах сложный, включает промежуточное протонирование атомов катализатора с последующим переносом протона на координированную молекулу ацетилена.

Главные различия системы проявляют в отношении реакции с молекулярным азотом. При катализе выделенным из белка FeMoco наблюдается только обратимое комплексообразование азота с восстановленным кластером, тогда как в присутствии MgMo комплекса происходит восстановление  $\text{N}_2$  до гидразина и аммиака. Нам не удалось получить каких-либо характеристик первичного комплексообразования  $\text{N}_2$ , поскольку в данной системе не наблюдается ингибирования восстановления ацетилена азотом. По-видимому, уже в условиях далеких от насыщения по азоту, характер образующегося диазотного комплекса таков, что он быстро и необратимо протонируется с образованием  $\text{N}_2\text{H}_4$  и  $\text{NH}_3$ .

## **Выводы**

1. Изучена кинетика восстановления  $\text{C}_2\text{H}_2$  и ингибирование этого процесса  $\text{N}_2$  и CO при катализе синтетическим MgMo комплексом в условиях, аналогичных для системы на основе экстрагированного из фермента активного центра нитрогеназы (FeMoco). Сравнение основных параметров реакций показало значительное сходство механизмов каталитического восстановления субстратов в присутствии природного и синтетического кластеров.
2. Изучено влияние потенциала внешнего донора электронов на каталитическое восстановление  $\text{C}_2\text{H}_2$  в присутствии FeMoco вне белка. Показано, что в зависимости от кислотности протонирующего агента, лимитирующей стадией может быть как перенос электрона от катода на каталитический кластер, так и стадия переноса протона в катализатор-субстратном комплексе.



3. Изучено влияние кислотности и химического строения источника протонов на реакции, катализируемые FeMoco вне белка. Установлено, что протонирование субстрата, координированного на каталитическом кластере, происходит через стадию первичного протонирования атомов катализатора, то есть опосредованно.
4. Исследованы температурные зависимости скоростей реакций, катализируемых FeMoco вне белка и MgMo комплексом. Показано, что строение и состав обоих кластеров благоприятствуют протеканию многоэлектронных реакций.
5. Впервые получены и охарактеризованы методом РСА монокристаллы двух алкокси-комплексов молибдена, образующихся при разном соотношении  $\text{MoCl}_5$  и  $\text{NaOCH}_3$  в реакционном растворе. Показано, что при соотношении  $\text{MoCl}_5:\text{NaOCH}_3$  1:3 образуется редкий представитель димерных алкоксидов молибдена (V),  $\text{Mo}_2(\text{OCH}_3)_8\text{Cl}_2$ , не содержащий оксо-групп, а при соотношении  $\text{MoCl}_5:\text{NaOCH}_3 = 1:5$  – анионный биядерный комплекс,  $[\text{Mo}_2\text{O}_2(\text{OCH}_3)_7]^-$ , связанный в кристаллической решетке в цепи посредством взаимодействия с катионной группировкой  $[\text{Na}(\text{CH}_3\text{OH})]^+$ .
6. На основании расчета методом функционала плотности найдено, что структура наименее энергичного изомера синтезированного биядерного комплекса молибдена (V) совпадает с экспериментальной. Также показано, что комплекс, является устойчивым к диссоциации в среде метилового спирта и его состав обусловлен реакциями сольволиза.

#### Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Баженова Т. А., Бардина Н. В., Петрова Г. Н., Боровинская М. А. Влияние потенциала внешнего донора электронов на закономерности катализа восстановления  $\text{C}_2\text{H}_2$  в присутствии активного центра нитрогеназы, выделенного из фермента. Изв. АН, Сер. хим., 2004, №8, с.1583-1591.
2. Бардина Н.В., Баженова Т.А., Петрова Г.Н., Шилова А.К., Шилов А.Е. Сравнительное изучение каталитического поведения синтетического полиядерного Mg-Mo комплекса и активного центра нитрогеназы (FeMoco), выделенного из фермента, в реакциях с  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  и CO. Изв. АН, Сер. хим., 2006, №5, с.766-774.
3. N.V. Bardina, T.A. Bazhenova, K.A. Lyssenko, M.Y. Antipin, Y.M. Shulga, T.A. Filina and A. F. Shestakov The unusual binuclear alkoxomolybdenum (V) complex oxo-groups free: synthesis, structure and IR-spectra. Mendeleev Communications, 2006, No 6, p. 307-308.
4. Bazhenova T. A., Borovinskaya M. A., Pavkaeva (Bardina) N. V., Petrova G. N. Study of the catalytic reactivity of FeMoco extracted from the protein matrix; substrate and inhibitor interactions // Materials of Memorial symposium dedicated to Professor Mark Vol'pin (1923-1996) «Modern trends in organometallic and catalytic chemistry» - Moscow, 2003, p.197.

5. Баженова Т. А., Бардина Н. В., Петрова Г. Н. Изучение влияния характера донора протонов на каталитическое поведение выделенного из белка активного центра нитрогеназы // Тез. докл. IV Всерос. конф. молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" - Саратов, 2003, с.54.
6. Баженова Т. А., Бардина Н. В., Петрова Г. Н. Влияние потенциала внешнего донора электронов и кислотности протонирующего агента на параметры катализа нитрогеназных реакций в присутствии выделенного из белка активного центра фермента // Тез. докл. XV симпозиума «Современная химическая физика» - Туапсе, 2003, с.132.
7. Nadezhda V. Bardina, Tamara A. Bazhenova, Galina N. Petrova The effect of the proton donor acidity and the external electron donor potential value on C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction reaction catalyzed by nitrogenase active center (FeMoco) isolated from the enzyme // Materials of the 6th European Nitrogen Fixation Conference – Toulouse, France, 2004, p. 25.
8. Bazhenova T.A., Borovinskaya M. A., Bardina N. V., Petrova G.N. Catalytic reactivity of FeMoco, active site of nitrogenase, outside the protein matrix // Materials of the 3d International Symposium “Molecular design and synthesis of supramolecular architectures” – Kazan, Russia, 2004, p. 61.
9. Бардина Н.В., Баженова Т.А., Петрова Г.Н. Сравнительное изучение каталитического поведения активного центра нитрогеназы (FeMoco) и его функционального аналога – полиядерного MoMg-комплекса // Тез. докл. XVI симпозиума «Современная химическая физика» - Туапсе, 2004, с. 164.
10. Бардина Н.В., Баженова Т.А., Петрова Г.Н. Влияние потенциала внешнего донора электронов и кислотности протонирующего агента на каталитическое поведение выделенного из белка активного центра нитрогеназы // Тез. докл. XXII Всероссийского симпозиума молодых ученых по химической кинетике – Москва, п/т «Клязьма», 2004, с. 49.
11. Бардина Н.В., Баженова Т.А., Петрова Г.Н. Влияние потенциала катода на реакцию восстановления ацетилена при катализе FeMo кофактором и MgMo комплексом; сравнительный анализ // Тез. докл. XXIV Всероссийской школы - симпозиума молодых ученых по химической кинетике – Москва, п/т «Березки», 2006, с. 17.
12. Бардина Н.В., Баженова Т.А., Петрова Г.Н. Шилова А.К., Шилов А.Е. Химическое моделирование каталитического действия фермента нитрогеназы с целью изучения механизма его функционирования // Тез. докл. VII Российской Конференции «Механизмы каталитических реакций» - СПб, Россия, 2006, т.2. с.195.

---

Заказ № 181/02/08 Подписано в печать 15.02.2008 Тираж 110 экз. Усл. п.л. 1,25

---

ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20  
*[www.cfr.ru](http://www.cfr.ru) ; e-mail: [info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)*

